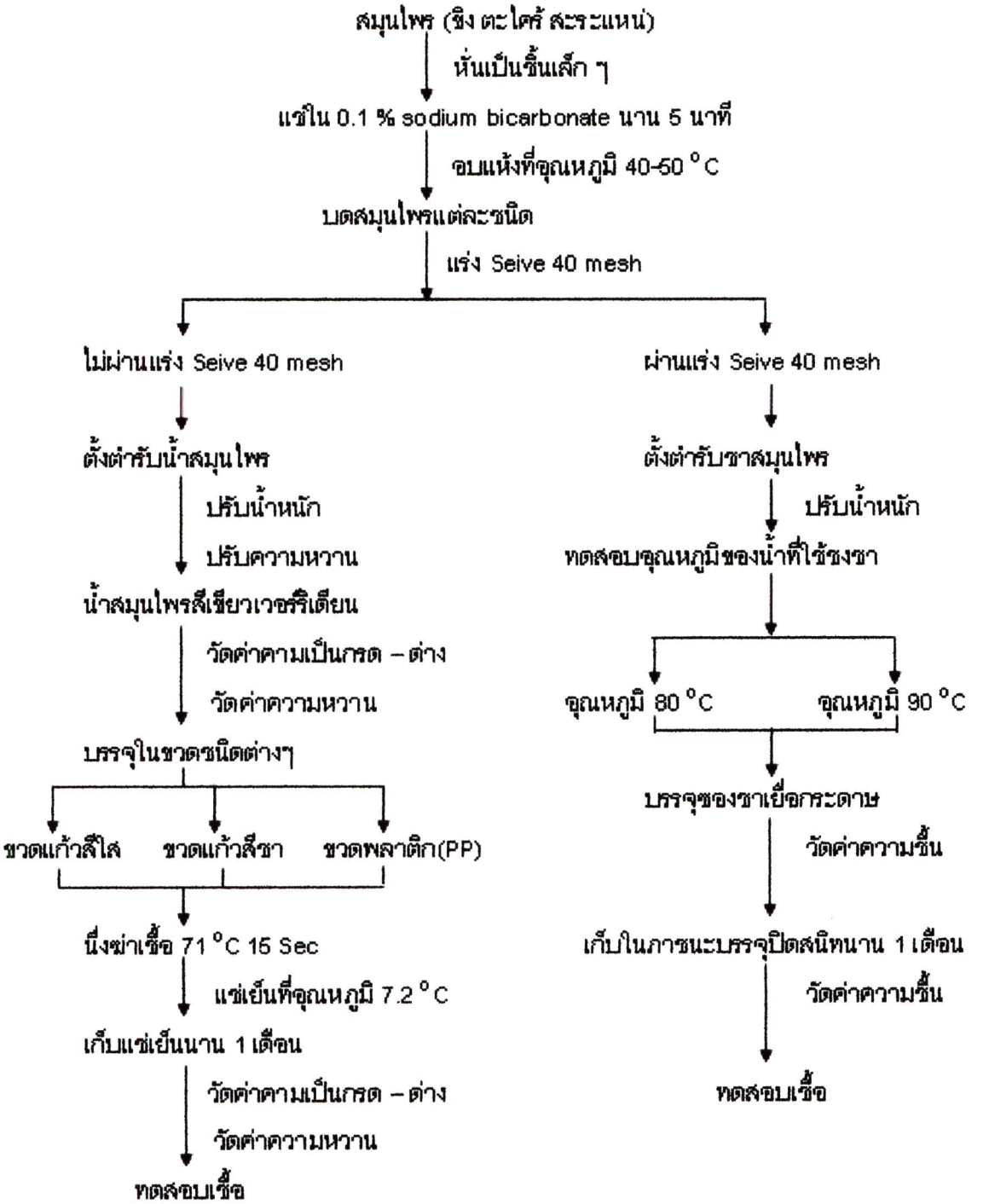
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 มีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้



3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และวัสดุ ที่ใช้ในงานวิจัย มีดังต่อไปนี้

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) ; (CP 224S), Sartorius, Germany
2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Topload) ; (PB 3002), metler, Switzerland
3. ตู้อบให้ความร้อน (Hot air oven) ; (UT 6760), Heraeus INTRUMENTS, Germany
4. Rotary evaporator ;รุ่น R-124, ยี่ห้อ BUCHI, Germany
5. pH meter ; รุ่น PP-15, ยี่ห้อ Sartorius, Germany
6. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (Moulinex) ; รุ่น DAA7, ยี่ห้อ Moulinex, Mexico
7. ตู้ทำความเย็น ; รุ่น R – W2550R, ยี่ห้อ HITHACHI, Japan
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ; รุ่น TOMY (ES – 315), ยี่ห้อ TOMY KOGYO Co., Ltd, Japan.
9. ตู้ปราศจากเชื้อ (Holten laminar) ; HB – 2448, **Denmark**.
10. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) ; รุ่น D – 63450, ยี่ห้อ Hanau, Germany
11. แร่งขนาดมาตรฐาน 40 mesh
12. ชุดกรอง negative pressure filter
13. เครื่องวัดปริมาณน้ำตาล (hand refactometer ยี่ห้อ Poc Ket PAL, Pocket. Refactometer, Atago Japan) (0 – 53 % Brix)
14. กระติกน้ำร้อน
15. Beaker
16. Test tube
17. Erlenmeyer flask
18. Volumetric flask
19. Petri disk
20. Pipette
21. Test tube rack
22. Stering rod

23. Spreader

24. Aluminum foil

25. Membrane filters cellulose acetate 0.22 ไมครอน, Japan

26. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

- Tryptic Soy Broth (TSB), LOT 9139963, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Tryptic Soy Agar (TSA), LOT 0266062, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Sabouraud Dextrose Agar (SDA), LOT 0270993, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Cooked meet Medium, LOT 0097572, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Cetrimide Agar Bese, LOT 0243335, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- XLD Agar, LOT 9075196, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- MacConkey Agar, LOT 8358205, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Eosin Meylene Blue Agar, LOT 9087125, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Mannitol Salt Agar, LOT 9187843, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- VJ Agar, LOT 7155211, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Triple Sugar Iron Agar, LOT 0235324, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Pseudomonas Agar F, LOT 5010051, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Pseudomonas Agar P, LOT 4321696, ยี่ห้อ Difco, ประเทศสหรัฐอเมริกา

27. ถุงชาแบบเยื่อกระดาษ

28. ถาดอลูมิเนียม

29. ผ้าขาวบาง

30. ขวดแก้วสีชา ขวดแก้วสีใสและขวดพลาสติกชนิด PP

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 ศึกษาการตั้งตำรับน้ำสมุนไพรสีเขียวเวอริเดียน

ตอนที่ 1.1 ขั้นตอนการอบแห้งสมุนไพร

1. หั่นสมุนไพรแต่ละชนิด (ขิง ตะไคร้) ให้เป็นชิ้นเล็ก นำไปแช่ใน 0.1 % w/v sodium bicarbonate นาน 5 นาที จากนั้นนำสมุนไพรมาพักให้สะเด็ดน้ำ

2. เด็ดสะระแหน่เอาเฉพาะใบ นำไปแช่ใน 0.1 % w/v sodium bicarbonate นาน 5 นาที จากนั้นนำสมุนไพรมาพักให้สะเด็ดน้ำ

3. อบแห้งขิง ตะไคร้ สะระแหน่ อัญชันที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส จนกว่าสมุนไพรจะแห้ง

4. บดสมุนไพรแต่ละชนิด ร่อนผงสมุนไพรด้วยตะแกรงเบอร์ 40

5. เก็บสมุนไพรที่ได้ใส่ภาชนะปิดสนิท

หมายเหตุ : การแช่ 0.1 % w/v sodium bicarbonate จุดประสงค์เพื่อปรับสภาพสมุนไพรให้เป็นด่างและช่วยรักษาสีให้คงความเขียวสด (รัตนา,2541)

ตอนที่ 1.2 ขั้นตอนการตั้งตำรับน้ำสมุนไพร

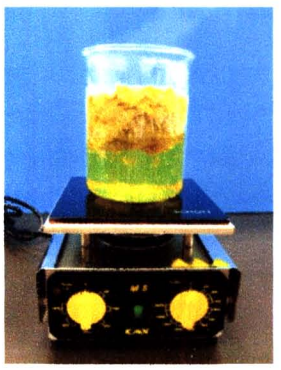
1.ทดลองตั้งตำรับน้ำสมุนไพรสีเขียวเวอริเดียน โดยใช้สมุนไพร เก็กฮวย คำฝอย อัญชัน ตะไคร้ ขิง สะระแหน่ ด้วยวิธีปรับน้ำหนักของสมุนไพรในอัตราส่วนต่าง ๆ

2. แยกต้มสมุนไพรแต่ละชนิดในน้ำเดือด โดยเตรียมสมุนไพรเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ต้มเดือดนาน 3 นาที

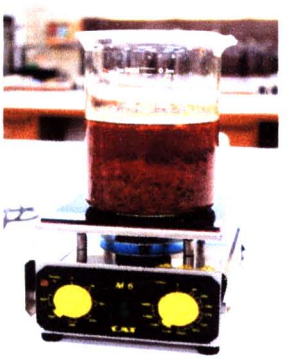
3. กรองน้ำสมุนไพรแต่ละชนิด นำมาผสมกันตามอัตราส่วน

4. ปรับความหวานด้วย Syrup BP

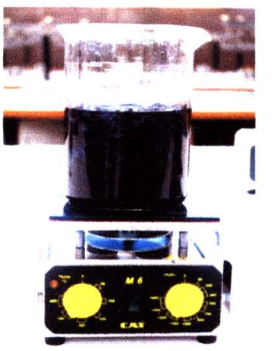
5. ดูลักษณะภายนอก สี กลิ่น ที่สังเกตได้



ก). ต้มดอกเก็กฮวย



ข). ต้มดอกคำฝอย



ค). ต้มดอกอัญชัน

(สมุนไพรที่ใช้สำหรับแต่งกลิ่นก็ใช้กรรมวิธีการเดียวกัน)

รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการเตรียมน้ำสมุนไพร

ตอนที่ 1.3 ทดสอบค่าความเป็นกรด – ด่าง และค่าความหวานของน้ำสมุนไพร

1. วัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ของน้ำสมุนไพรที่เตรียมได้
2. วัดค่าความหวานของน้ำสมุนไพรที่เตรียมได้
3. วัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ของน้ำสมุนไพรเมื่อเก็บแช่เย็นไว้นาน 1 เดือน

ตอนที่ 1.4 การทำให้ปราศจากเชื้อ

1. กรองน้ำสมุนไพรสีเขียวเวอร์ริเดียนด้วย Membrane filter 0.22 ไมครอน (คณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม, 2549) บรรจุขวดแก้วสีชา ขวดแก้วสีใสและขวดพลาสติกชนิด PP

2. บรรจุน้ำสมุนไพรสีเขียวเวอร์ริเดียนในขวดแก้วสีชา ขวดแก้วสีใสขวดพลาสติกชนิด PP (ขวดที่ทนความร้อนได้) นำไปพาสเจอไรซ์ด้วยวิธี HTST คือการพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 71 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 7.2 องศาเซลเซียส (เชษฐา, 2548)

3. ดูลักษณะภายนอก สี กลิ่น ที่สังเกตได้

ก). กรองด้วยเครื่องกรอง Negative pressure filter

ข). บรรจุขวดแก้วสีชา ขวดแก้วสีใสและขวดพลาสติกชนิด PP

รูปที่ 3.2 แสดงการกรองด้วยเครื่องกรอง Negative pressure filter และบรรจุภาชนะชนิดต่าง ๆ

ตอนที่ 1.5 ทดสอบบรรจุภัณฑ์ที่บรรจุน้ำสมุนไพร ที่เหมาะสมที่สุด โดยเปรียบเทียบจากลักษณะทางกายภาพ

บรรจุน้ำสมุนไพรที่เตรียมได้ในขวดสีใส ขวดสีชาและขวดพลาสติก ทดสอบการเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น บันทึกอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ

ตอนที่ 1.6 การวิเคราะห์เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำสมุนไพร

1. ชั่งตัวอย่างน้ำสมุนไพร 10 กรัม มาทำ dilution 1:10, 1:100, 1:1000 ของตัวอย่าง โดยใช้ buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
2. นำแต่ละ dilution มาหาปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.1 Pour plate method

2.1.1 Pipette ตัวอย่างแต่ละ dilution 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ทำ dilution ละ 2 จาน

2.1.2 ใช้ SDA ที่หลอมเหลวแล้วและอุ่นอยู่ใน water bath (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) มาเทลงจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างดังกล่าวอยู่ ปิดฝาจานแล้วหมุน (swirl) เพื่อผสมตัวอย่างและอาหารให้เข้ากัน ทำ dilution ละ 2 จาน

2.1.3 ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงนำไปบ่มเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3– 5 วัน

2.1.4 นับจำนวนโคโลนีและบันทึกลักษณะโคโลนีเดี่ยวแต่ละชนิด คำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์

2.2 Spread plate method

2.2.1 Pipette ตัวอย่างแต่ละ dilution 0.1 มิลลิลิตร หยดบนผิวหน้า TSA ทำ dilution ละ 2 จาน

2.2.2 ใช้ spreader ช่วยเกลี่ยให้น้ำกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร

2.2.3 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส ดูผลภายใน 24 – 48 ชั่วโมง

2.2.4 นับจำนวนโคโลนีและบันทึกลักษณะโคโลนีเดี่ยวแต่ละชนิด คำนวณหา ปริมาณจุลินทรีย์

2.3 Most probable number estimate

2.3.1 Pipette ตัวอย่างแต่ละ dilution ใส่ในหลอดอาหาร TSB 9 มิลลิลิตร โดยใส่ dilution ละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.3.2 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส ดูผลภายใน 24 – 48 ชั่วโมง

2.2.3 บันทึกจำนวนหลอด TSB ที่ขุ่นในแต่ละ dilution และลักษณะการขุ่นของแต่ละหลอด

2.4 หาแบคทีเรียก่อโรค

2.4.1 ชั่งตัวอย่างน้ำสมุนไพร 10 กรัม เทลงในอาหาร TSB ปริมาณ 90 มิลลิลิตร

2.4.2 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.3 นำตัวอย่างที่บ่มเชื้อแล้วไปเลี้ยงลงในอาหาร Differential media เพื่อตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

2.4.4 ทำการทดสอบในกรณีที่สงสัยจาก Differential media นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.5 รายงานผลว่าพบหรือไม่พบเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย

ตอนที่ 2 ศึกษาการตั้งตำรับชาสมุนไพรสีเขียวเวอร์ริเดียน

ตอนที่ 2.1 ขั้นตอนการเตรียมชาสมุนไพร

1. ทดลองเตรียมชาสมุนไพรสีเขียวเวอร์ริเดียน โดยใช้สมุนไพรที่บดเรียบร้อยแล้วได้แก่ เก็กฮวย คำฝอย อัญชัน ตะไคร้ ขิง และสะระแหน่ ด้วยวิธีปรับน้ำหนักของสมุนไพรในอัตราส่วนต่าง ๆ

2. ดูลักษณะภายนอก สี กลิ่น ที่สังเกตได้

ตอนที่ 2.2 ขั้นตอนการทดสอบอุณหภูมิของน้ำที่ใช้สำหรับชงชาสมุนไพร เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดโดยดูจากความพึงพอใจด้านสี กลิ่น และรสชาติ

1. ทดลองชงชาที่อุณหภูมิน้ำ 80 และ 100 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดโดยดูจากความพึงพอใจด้านสี กลิ่น และรสชาติ

2. ดูลักษณะภายนอก สีและกลิ่นที่สังเกตได้ บันทึกผล

ตอนที่ 2.3 ขั้นตอนการบรรจุผงชาใส่ซองเยื่อกระดาษ

1.บรรจุผงสมุนไพรสูตรต่าง ๆ ในถุงชาแบบเยื่อกระดาษ

2.วัดค่าความชื้น บันทึกผล

ตอนที่ 2.4 ทดสอบการเก็บรักษาโดยเก็บในภาชนะปิดสนิทนาน 1 เดือน

1. ทดสอบการเก็บรักษาโดยเก็บในภาชนะปิดสนิทนาน 1 เดือน
2. วัดความชื้น บันทึกผล

ตอนที่ 2.5 การวิเคราะห์เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียปนเปื้อนในชาสมุนไพร

1. ชั่งตัวอย่างผงชาสมุนไพร 10 กรัม เติมลงใน buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นเป็น 1:10 ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1:100, 1:1000
2. นำแต่ละ dilution มาหาปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.1 Pour plate method

2.1.1 Pipette ตัวอย่างแต่ละ dilution 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ทำ dilution ละ 2 จาน

2.1.2 ใช้ SDA ที่หลอมเหลวแล้วและอุ่นอยู่ใน water bath (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) มาเทลงจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างดังกล่าวอยู่ ปิดฝาจานแล้วหมุน (swirl) เพื่อผสมตัวอย่างและอาหารให้เข้ากัน ทำ dilution ละ 2 จาน

2.1.3 ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงนำไปบ่มเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3– 5 วัน

2.1.4 นับจำนวนโคโลนีและบันทึกลักษณะโคโลนีเดี่ยวแต่ละชนิด คำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์

2.2 Spread plate method

2.2.1 Pipette ตัวอย่างแต่ละ dilution 0.1 มิลลิลิตร หยดบนผิวหน้า TSA ทำ dilution ละ 2 จาน

2.2.2 ใช้ spreader ช่วยเกลี่ยให้น้ำกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร

2.2.3 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส

2.2.4 นับจำนวนโคโลนีและบันทึกลักษณะโคโลนีเดี่ยวแต่ละชนิด คำนวณหา ปริมาณจุลินทรีย์

2.3 Most probable number estimate

2.3.1 Pipette ตัวอย่างแต่ละ dilution ใส่ในหลอดอาหาร TSB 9 มิลลิลิตร โดยใส่ dilution ละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.3.2 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส ดูผลภายใน 24 – 48 ชั่วโมง

2.2.3 บันทึกจำนวนหลอด TSB ที่ขุ่นในแต่ละ dilution และลักษณะการขุ่นของแต่ละหลอด

2.4 หาแบคทีเรียก่อโรค

2.4.1 ชั่งตัวอย่างชาสมุนไพร 10 กรัม เทลงในอาหาร TSB ปริมาณ 90 มิลลิลิตร

2.4.2 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.3 นำตัวอย่างที่บ่มเชื้อแล้วไปเลี้ยงลงในอาหาร Differential media เพื่อตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

2.4.4 ทำการทดสอบในกรณีที่สงสัยจาก Differential media นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.5 รายงานผลว่าพบหรือไม่พบเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย